

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Fitotoxicidad de pigmentos textiles en aguas residuales biorremediadas

VIDA-357

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Jeremy Leonardo Piguave Toala

Guayaquil - Ecuador

Año: 2024

Dedicatoria

Dedicado a todos aquellos que
encontraron en la enseñanza una nueva
forma de aprender.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi familia por el apoyo constante recibido, a la PhD. Nardy Diez por su instrucción, al MSc. Jeffrey Vargas por sus enseñanzas, a los miembros del laboratorio de Proteómicas dueños de mis conocimientos y habilidades en laboratorio, y a todos mis amigos que me han acompañado durante mi etapa estudiantil.

Declaración Expresa

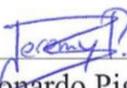
Yo Jeremy Leonardo Piguave Toala acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 29 de mayo del 2024.


Jeremy Leonardo Piguave Toala

Evaluadores

MSc. Diego Gallardo

Profesor de Materia

PhD. Nardy Diez

Tutor de proyecto

Resumen

Las aguas residuales de industrias textiles representan una fuente de contaminación por tintes textiles sintéticos. La biorremediación para estas aguas residuales es una solución efectiva. Sin embargo, un protocolo de remediación basado en el uso de bacterias debe ser capaz de degradar el pigmento contaminante y asegurar la eliminación de cualquier componente tóxico en el proceso. Para esto, se degradó un tinte sintético por remediación bacteriana obteniendo un agua residual, esta fue analizada por un ensayo de fitotoxicidad con semillas de *Phaseolus vulgaris*, donde se complementó el análisis de toxicidad con observaciones microscópicas y análisis de proteínas. La investigación reveló la posibilidad de degradar un tinte textil sintético utilizando biorremediación, este mecanismo a su vez no presentó toxicidad que impidiera el crecimiento de organismos vegetales, mismas que presentaron un crecimiento y desarrollo normal. De esta manera, se concluye el correcto uso de biorremediación bacteriana aplicada en la industria textil para el tratamiento de aguas residuales contaminadas por tintes textiles.

Palabras Clave: Biorremediación, Coomassie Brilliant Blue, bacteria, prueba de germinación, *Phaseolus vulgaris*.

Abstract

*Wastewater from textile industries is a source of contamination of synthetic textile dyes. Bioremediation for this wastewater is an effective solution. However, a remediation protocol based on the use of bacteria must ensure the degradation of the contaminating pigment and the removal of any toxic components in the process. For this, a synthetic dye was degraded by bacterial remediation obtaining a wastewater, which was analyzed by a phytotoxicity assay with *Phaseolus vulgaris* seeds. In addition, the toxicity analysis was complemented by microscopic observations and protein analysis. The study revealed the possibility of degrading a synthetic textile dye using bioremediation, and this mechanism did not present toxicity that affected the growth of plant organisms, these organisms displayed normal growth and development. Thus, this study concludes the appropriate use of bacterial bioremediation applied in the textile industry for the treatment of textile dye-contaminated wastewater.*

Key words: *Bioremediation, Coomassie Brilliant Blue, bacteria, germination test, *Phaseolus vulgaris*.*

Índice general

Evaluadores	v
Resumen	vi
<i>Abstract</i>	vii
Índice general	viii
Abreviaturas	ix
Simbología	x
Índice de figuras.....	xi
Capítulo 1.....	i
1.1 Descripción del Problema	4
1.2 Justificación del Problema.....	4
1.3 Objetivos.....	5
<i>1.3.1 Objetivo general</i>	5
<i>1.3.2 Objetivos específicos</i>	5
1.4 Marco teórico.....	5
Capítulo 2.....	2
2. Metodología.....	9
Capítulo 3.....	12
3. Resultados y análisis	13
Capítulo 4.....	22
4.1 Conclusiones y recomendaciones	23
4.1.1 Conclusiones.....	23
4.1.2 Recomendaciones	23
Referencias.....	25

Abreviaturas

ANOVA	Analysis Of Variance
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
DTT	Dithiothreitol
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
PCA	Principal component analysis
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	Trichloroacetic acid
TSB	Trypticase Soy Broth

Simbología

H₂O₂ Peróxido de Hidrógeno

kDa Kilodaltons

pH Potencial de Hidrógeno

Índice de figuras

- Figura 1:** *Porcentaje de germinación de cada tratamiento*
- Figura 2:** *Diagrama de caja: longitud de las raíces bajo tratamiento con CBB*
- Figura 3:** *Diagrama de caja: longitud de las raíces bajo tratamiento con tinte degradado por K6*
- Figura 4:** *Diagrama de caja: longitud de las raíces bajo tratamiento con tinte degradado por C6*
- Figura 5:** *PCA – Biplot + cluster de todos los tratamientos*
- Figura 6:** *Observaciones microscópicas de raíces en tinte CBB*
- Figura 7:** *Observaciones microscópicas de raíces en tinte degradado por C6*
- Figura 8:** *Observaciones microscópicas de raíces en Agua*
- Figura 9:** *SDS-PAGE: perfil de proteínas en las raíces crecidas*
- Figura 10:** *PCA: Agrupamiento de los diferentes tratamientos según sus proteínas del SDS-PAGE*
- Figura 11:** *ANOVA: Proteínas del SDS-PAGE según su relevancia para explicar las diferencias muestrales*
- Figura 12:** *Mapa de calor de las proteínas del SDS-PAGE*

Capítulo 1

1 Introducción

La industria textil es un área productiva de gran crecimiento mundial, la necesidad del ser humano de emplear prendas acordes a las actividades humanas y el desarrollo de la moda han llevado a que esta industria crezca un 4,25% cada año según datos de 2018, generando a su vez ganancias de USD 900 mil millones (Llanos, 2023). En Ecuador el panorama económico también sigue dicha tendencia, la industria textil aporta el 21% del trabajo en el área de la manufactura, con alrededor de 703 empresas grandes y medianas registradas según INEC 2020 (Guevara, 2024; Nuñez, 2023). Aun así, esta industria también se ha reportado como una de las más contaminantes. Se estima que el 50% de los colorantes utilizados en procesos de teñido a nivel mundial son desechados tras una primera lavada dentro del proceso de tinción usual de textiles, haciendo que las aguas residuales de esta industria estén contaminadas con el pigmento utilizado (Garcés et al, 2005). En el caso de Ecuador existe una notable mejoría con respecto a la contaminación producida por este sector. Aun así, se estima que el 52,95% de las aguas residuales de carácter industrial son emitidas por el sector textil, aguas residuales que contienen entre el 20 y el 30% de la cantidad de tinte inicial del proceso de tinción, de estas aguas se estima que el 48,95% son tratadas antes de ser desechadas, el resto no pasa por un proceso que elimine o reduzca la presencia del tinte (Guevara, 2024; Nasamues, 2021).

En este punto, se han propuesto varias soluciones para la contaminación de aguas residuales con pigmentos textiles. En el Ecuador usualmente se utilizan procesos de decantación, centrifugación y filtración de las aguas residuales para separar la mayor cantidad de pigmentos sólidos, mismos que luego son procesados y tratados como lodos residuales (Bravo & Caiza, 2022). Sin embargo, también existen otras opciones disponibles utilizando materiales adsorbentes, compuestos oxidativos que reaccionen con los pigmentos e incluso el uso de agentes biológicos que degraden el pigmento en cuestión (Deng et al, 2020), de todos

estos, los agentes biológicos capaces de degradar pigmentos de uso textil son una alternativa en constante desarrollo gracias al descubrimiento de protocolos efectivos y económicos pudiendo reducir más del 90% del pigmento textil en las aguas residuales según el organismo empleado y la naturaleza química del tinte (Wang et al, 2022; Ramos et al, 2023; Moyo et al, 2022).

De esta manera, la biorremediación, o uso de técnicas biológicas para la descontaminación de matrices, se postula como una herramienta usual de remediación tanto para ecosistemas contaminados, como para eliminar tóxicos presentes en lodos, cabinas de aire y aguas residuales, todos estos de carácter industrial (Shah & Shah, 2020). La técnica de biorremediación empleada depende del entorno y el contaminante en cuestión (Patel et al., 2022). Así, la fitorremediación, o uso de plantas para descontaminación, se emplea aprovechando la capacidad de las especies vegetales en absorber componentes del suelo y almacenarlos en sus tejidos, dicho proceso luego deberá recibir un tratamiento para asegurar la eliminación del tóxico, sobre todo si el contaminante es un metal pesado como mercurio, plomo o cadmio (Bala et al., 2022). Para fines más específicos e industriales, se suele utilizar microorganismos como bacterias y hongos, o compuestos como enzimas. Estos últimos suelen ser soluciones con mayor especificidad para tratar contaminantes, al mismo tiempo que son más rápidas de efectuar según la naturaleza del tóxico y la matriz a remediar (Shanmugam et al., 2022). Aun así, estas técnicas no están exentas de problemas y desventajas, ya que suele ser común que el contaminante a remediar provoque cambios en el entorno que imposibiliten el correcto actuar de los microorganismos identificados para la remediación, así mismo, las enzimas aplicadas como técnica de remediación pueden perder su capacidad metabólica antes de desintegrar el tóxico si este último es una molécula compleja que requiere muchos ciclos de corte enzimático (Somu et al., 2022). Finalmente, debido a la especificidad de las enzimas y los microorganismos, es posible que el contaminante original sea transformado generando

productos inesperados que resulten igual o más tóxicos que el compuesto original, dando lugar a un nuevo problema de contaminación (Afrin et al., 2021).

Por esa razón, los protocolos de biorremediación deben someterse a un análisis destinado a predecir posibles problemas de implementación tanto para aguas residuales de procesos industriales como para remediación de un ecosistema. Así, es necesario confirmar la detoxificación completa de los contaminantes estudiando la posible toxicidad de los metabolitos resultantes.

1.1 Descripción del Problema

Ante el descubrimiento de bacterias capaces de metabolizar tintes sintéticos como el Coomassie Brilliant Blue (CBB), surge la necesidad de evaluar la toxicidad de los metabolitos resultantes del proceso metabólico de detoxificación, con el fin de certificar que un protocolo destinado a la remediación de aguas residuales de industrias que utilicen tintes textiles sintéticos como el CBB pueda degradar el pigmento textil y que el agua residual no presente toxicidad, para ello se puede evaluar la capacidad de germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris* utilizando el agua residual obtenida luego del proceso de biorremediación.

1.2 Justificación del Problema

Los protocolos de biorremediación encontrados pueden asegurar la descontaminación del agente tóxico, esto incluye tanto la degradación de pigmento como la detoxificación del agua residual producto del proceso biorremediador. Asegurando la prevalencia de un protocolo eficaz para tratar este tipo de aguas residuales industriales y ayudando así a remediar la contaminación de afluentes de agua desde su origen.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la fitotoxicidad de las aguas residuales del proceso de degradación de pigmentos textiles mediante el análisis de germinación en semillas de *Phaseolus vulgaris* para la determinación de un protocolo de detoxificación.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar un protocolo de degradación de pigmentos textiles para la obtención de aguas residuales que contengan los metabolitos resultantes del proceso de detoxificación del compuesto original.
2. Implementar un ensayo de germinación en semillas de *Phaseolus vulgaris* utilizando el pigmento textil y las aguas residuales de la detoxificación como fuentes nutritivas del sustrato.
3. Observar las diferencias morfológicas en las regiones transversales de las raíces con mejor tratamiento a través de un microscopio óptico.
4. Realizar un perfil proteómico con las proteínas extraídas de raíces con mejor tratamiento para identificar posibles diferencias a nivel molecular de los tratamientos.

1.4 Marco teórico

La biorremediación involucra la aplicación de técnicas biológicas para el tratamiento de compuestos complejos considerados contaminantes de alguna matriz biológica. En el caso de las bacterias utilizadas como agentes de biorremediación, se hace uso de las capacidades que tiene este diverso grupo de microorganismos para metabolizar estos contaminantes presentes en el entorno. En general, las bacterias pueden crecer en ambientes hostiles incluyendo lugares donde escasean fuentes básicas de alimento, recurriendo así a la degradación de compuestos orgánicos complejos (Kabede et al, 2021; Mehrotra et al., 2021). Por esta razón, se han encontrado algunas bacterias capaces de sobrevivir a temperaturas

extremas, presiones altas e incluso alimentándose de cadenas complejas de carbono como el petróleo, esto último lo logran produciendo enzimas que degradan el petróleo en compuestos más pequeños que pueden ser aprovechados como fuentes de energía (Sales da Silva et al, 2020). En este aspecto, existen bacterias capaces de producir enzimas que degraden contaminantes como los pigmentos textiles, utilizando así los metabolitos resultantes de esa degradación como fuente de energía (Pinheiro et al, 2022).

El proceso metabólico de las enzimas empieza cuando estas biomoléculas se unen al sustrato, en este caso el pigmento textil, al unirse cortan dependiendo de la naturaleza de la enzima, algunas enzimas reconocen patrones de los elementos químicos y cortan en esos sitios al sustrato, otros reconocen estructuras químicas y proceden a cortar siguiendo ese reconocimiento (Ihsanullah et al., 2020; Vaz et al., 2022). Una vez cortado, los restos serán utilizados por la bacteria para su alimentación y crecimiento, aun así, es posible que algunos restos del proceso enzimático no sean utilizados por las bacterias dependiendo de que estructuras haya cortado la enzima o qué elementos contenga el tinte en su composición química. De esta manera, existe la posibilidad que parte del degradado enzimático sea contaminante o tóxico, invalidando el proceso de remediación (Bhandari et al., 2021; Seyyed et al., 2021).

Un contaminante tóxico se define como aquel agente que interviene en los procesos vitales. Existen varias formas en las que un agente tóxico actúa, ya sea al cambiar el pH del entorno, secuestrar elementos cruciales como oxígeno o carbono, o incluso intervenir en los procesos químicos asociados a la genética de las células. De esta manera, los contaminantes tóxicos pueden provocar daños celulares, causar enfermedades e incluso provocar la muerte (Panigrahy et al., 2022; Liu et al., 2022).

Ante eso, es necesario implementar estudios destinados al análisis de posibles efectos tóxicos. Existen diferentes protocolos a nivel celular dependiendo del análisis a efectuar,

algunos procesos miden el daño fenotípico evaluando deformidades en el crecimiento de plantas, células animales o colonias bacterianas, otros protocolos buscan presencia de metabolitos que indiquen estrés o problemas metabólicos relacionados con la presencia del componente tóxicos, mientras que algunos más específicos evalúan deformidades a nivel genético (D. Krewski et al., 2019; Camilo et al., 2022). En cuanto a agentes tóxicos de carácter ambiental, es fundamental emplear un análisis de toxicidad general como las evaluaciones de fitotoxicidad. En los análisis de fitotoxicidad se busca estudiar posibles efectos tóxicos en tejidos vegetales ante un entorno contaminado. Usualmente, se estudia el posible efecto del contaminante en la germinación de semillas, en este caso, se prepara un experimento donde se compara el desarrollo de semillas de alguna especie vegetal en condiciones normales con el crecimiento de semillas afectadas por la presencia de algún contaminante tóxico, todo esto evaluado al cabo de la germinación la cual dependerá de la especie vegetal escogida (Zafar et al., 2023). Finalmente, el análisis se basa en la comparación de diferencias fenotípicas visuales como la longitud de la raíz y el número de semillas que han germinado, así como otros estudios que involucran la evaluación microscópica de los tejidos vegetales y la presencia de proteínas o metabolitos que indiquen estrés, expresión fenotípica inusual o competitividad con hormonas propias de las plantas.

Capítulo 2

2. Metodología

Para evaluar el efecto fitotóxico presente en el degradado metabólico de pigmentos de uso textil, se procedió a elaborar un diseño experimental que comenzó con la degradación del tinte comercial Coomassie Brilliant Blue (CBB) inoculando, en experimentos separados, dos bacterias con capacidad de degradación de pigmentos textiles, las cepas inoculadas llevan por código C6 y K6. Luego, se recuperó las aguas residuales después de haber sido degradado el tinte. Posteriormente, se procedió a utilizar estas aguas residuales en un ensayo de evaluación fitotóxica para finalmente realizar el análisis estadístico necesario que determine diferencias significativas en el estudio.

Proceso de degradación del tinte y obtención de las aguas residuales

Cada cepa bacteriana en estudio, C6 y K6, fue inoculada en ensayos distintos que contenían 250 ml de medio TSB y 125mg/L de tinte CBB. Luego, ambos experimentos fueron incubados por 12 días a una temperatura de 37°C manteniendo una agitación de 150 rpm. Una vez cumplido los 12 días de degradación, cada ensayo fue centrifugado a 7500xG en 4°C por 20 minutos, de esta manera se extrajo el agua residual de la degradación del tinte.

Prueba de fitotoxicidad

El agua residual obtenida tanto por la bacteria C6 como por K6, junto con otra preparación independiente del tinte inicial CBB fueron utilizados para elaborar 5 diluciones en agua destilada: al 50%, 25%, 10%, 5% y 1%. Cada dilución fue utilizada independientemente para estimular la germinación de semillas en un ensayo de fitotoxicidad. En resumen, 10 semillas de *Phaseolus vulgaris* fueron esterilizadas realizando un lavado superficial con H₂O₂ durante 2 minutos, luego, fueron lavadas reiteradamente con agua destilada con el fin de eliminar rastros de H₂O₂. Posteriormente, las semillas fueron ubicadas sobre un papel filtro colocado dentro de una placa Petri, se procedió a agregar 5 mL de alguna dilución realizada anteriormente para inmediatamente sellar la placa petri. Se realizaron 3 réplicas para cada dilución hecha además de

emplear agua destilada como un experimento control positivo de germinación. Finalmente, las 48 placas Petri fueron almacenadas en completa oscuridad a una temperatura de 20°C por 7 días. Cumplido este tiempo, se procedió a contabilizar el número de semillas que habían germinado en cada placa, además, se midió la longitud de las raíces en aquellas semillas que presentaban germinación. Estos datos fueron utilizados para evaluar estadísticamente las diferencias en la germinación para cada grupo evaluado. Las raíces de cada uno de los tratamientos fueron almacenadas a -80°C para futuros análisis.

Análisis al microscopio

Una vez evaluado los mejores tratamientos, se realizaron cortes aleatorios transversales en las raíces de los crecimientos con sustrato C6 10%, CBB 10% y agua. Inmediatamente, fueron observadas con ayuda de un microscopio, anotando y describiendo cada anomalía observada.

Análisis de proteínas

Para el análisis de proteínas, 0.5 gramos de las raíces de los crecimientos con sustrato C6 10%, CBB 10% y agua fueron triturados y centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue solubilizado con TCA 10% acetona, tratado en vortex y centrifugados nuevamente. Luego, se recuperó el pellet y se añadió Acetona 80%, esta solución fue nuevamente homogenizada por vortex para ser luego centrifugada. Finalmente se extrajo toda la acetona y se la dejó secar al aire libre para añadir 60 µL de medio de solubilización (Urea 7M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 100mM).

Para el SDS-PAGE, 30 µL de proteína extraída en cada tratamiento fue utilizado para averiguar su perfil de proteómico, la electroforesis se realizó a 100 voltios durante 1 hora, fue teñido con una solución Coomassie Brilliant Blue G-250 0.1%, Metanol 50% y Ácido acético glacial 10% por una hora en agitación, finalmente fue desteñido con una solución de Metanol 5% y ácido acético 7% en agitación durante 12 horas. El gel resultante fue escaneado con un transiluminador Stella Raytest con ayuda del software Xstella 1.0, además del software

ImageLab 6.0 de Biorad para el análisis de las bandas e intensidad, los datos obtenidos fueron tratados en el sistema online MetaboAnalyst 6.0.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados utilizando análisis de varianzas (ANOVA) de una vía, con un nivel de significancia de 0.05. Así mismo, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) con agrupamiento para la observación de similitudes en los grupos evaluados.

Capítulo 3

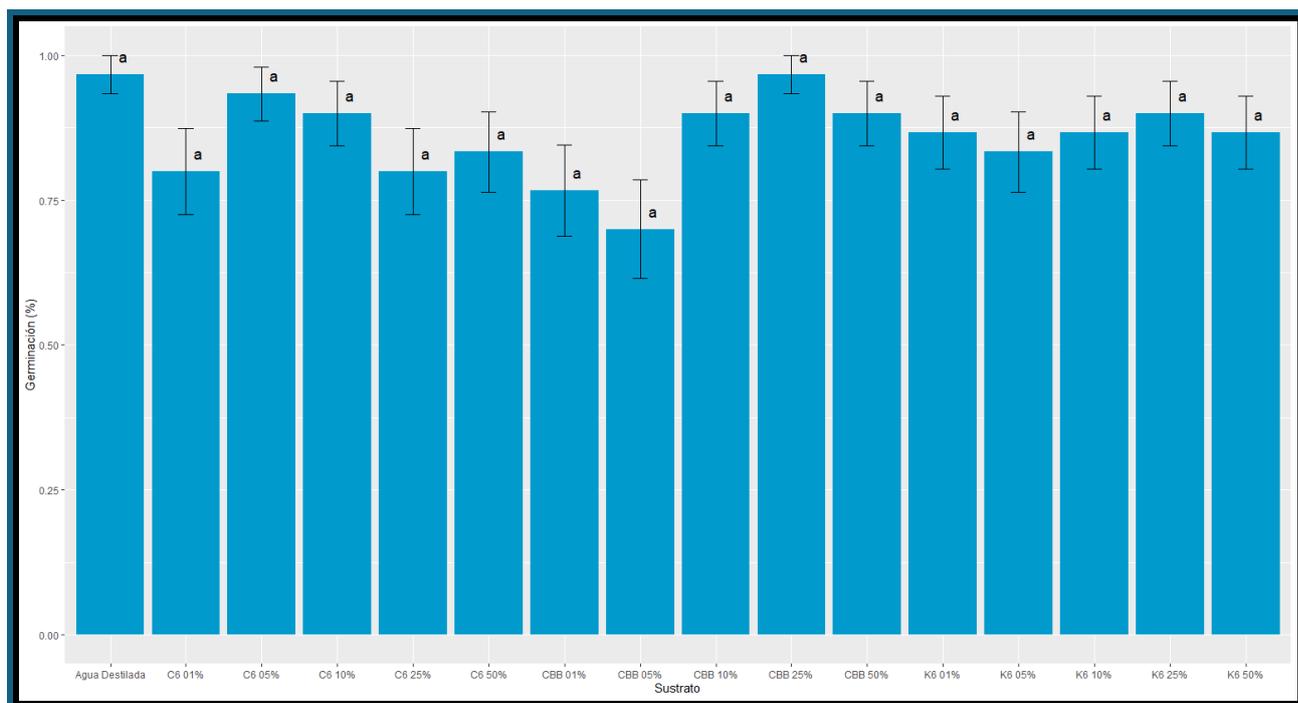
3. Resultados y análisis

Fitotoxicidad por germinación

La fitotoxicidad se evaluó cuantificando el porcentaje de germinación y la longitud de las raíces tras 7 días de crecimiento y comparándolas con ANOVA (Tukey: $p < 0.05$). En cuanto a la germinación de las semillas de *Phaseolus vulgaris*, ningún grupo presentó diferencias significativas (Fig. 1). Esto podría deberse a la poca genotoxicidad y mutagenicidad del Coomassie Brilliant Blue demostrada en células eucariotas sometidas a corto y largo plazo de tratamiento (Debora et al., 2009), por lo que es probable que la acumulación a lo largo del tiempo de este tinte realmente represente un problema, sobre todo por la naturaleza de interacción del CBB con proteínas y la capacidad de degradarse en otros compuestos metabólicamente tóxicos (Nurul et al., 2022; Zhao et al, 2021).

Figura 1

Porcentaje de germinación de cada tratamiento



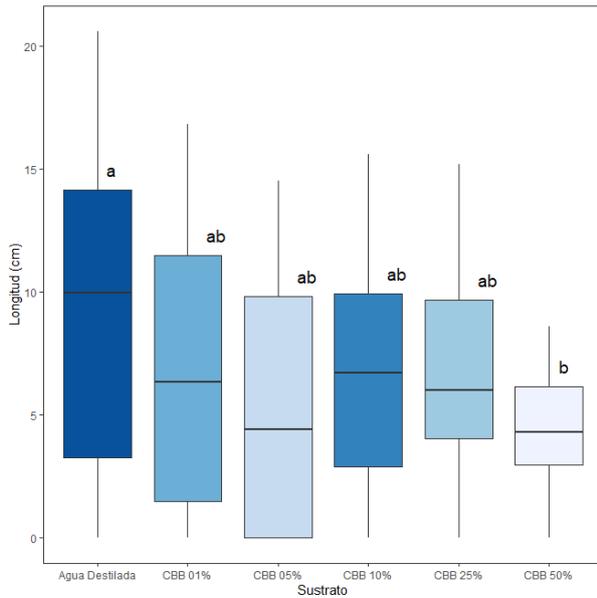
Nota. Se muestra el porcentaje de germinación obtenido para cada tratamiento. Se muestra en letras las comparaciones muestrales de ANOVA (Tukey: $p < 0.05$).

Por otro lado, la evaluación de la longitud de las raíces demostró diferencias significativas para varios grupos. En primer lugar, la mayor concentración del tinte CBB y sus degradados por las bacterias C6 y K6 provocaron un lento crecimiento de las raíces de *Phaseolus vulgaris*, la dilución de estos sustratos presentó un buen resultado en el crecimiento de las raíces medido en su longitud al día 7 (Fig. 2, 3 y 4). Aun así, la dilución del tinte producto del metabolismo de la bacteria C6 presentó un mejor resultado llegando a ser comparable estadísticamente con el crecimiento normal de las raíces en presencia de agua (Fig. 4).

Posteriormente, la longitud de las raíces y su porcentaje de germinación, así como el índice de germinación obtenido a partir de las dos primeras variables fueron evaluadas a través de un Análisis de Componentes Principales, como se muestra en la Figura 5, el PCA logró agrupar según las características descritas a 6 grupos. Al igual que ANOVA, los tratamientos con mayor concentración de tinte con y sin tratamiento obtuvieron un menor índice de germinación y desarrollo de raíces, por lo que su presencia logra atrasar la germinación y desarrollo de las semillas. Luego, los tratamientos con diluciones de tinte generalmente lograron promover el desarrollo de raíces o la germinación de las semillas de manera independiente, indicando que la semilla encuentra el entorno oportuno para su germinación, pero no para la extracción de nutrientes que permitan su crecimiento. En cuanto al degradado de K6, las diluciones de este sustrato promueven en general tanto la germinación como el desarrollo de las semillas, aunque lo hace en menor medida comparada con el desarrollo del control con agua destilada. El sustrato control de agua destilada promovió en gran medida la germinación y desarrollo de las semillas y, al igual que ANOVA, agrupó las diluciones del tinte degradado por la bacteria C6 al 5 y 10%. De esta manera, C6 se establece como la bacteria capaz de utilizar una ruta metabólica que degrade el tinte CBB derivado de trifenilmetano, al mismo tiempo que sus metabolitos resultantes en bajas concentraciones no inducen cambios importantes en la germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris*, determinando así la detoxificación del pigmento textil.

Figura 2

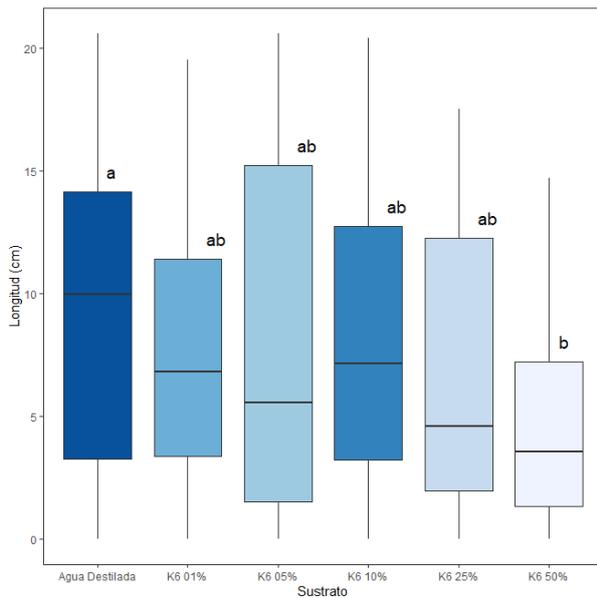
Diagrama de caja: longitud de las raíces bajo tratamiento con CBB



Nota. Se muestra la longitud en cm de las raíces tratadas con CBB en cada dilución realizada. Se muestra en letras las comparaciones muestrales de ANOVA (Tukey: $p < 0.05$).

Figura 3

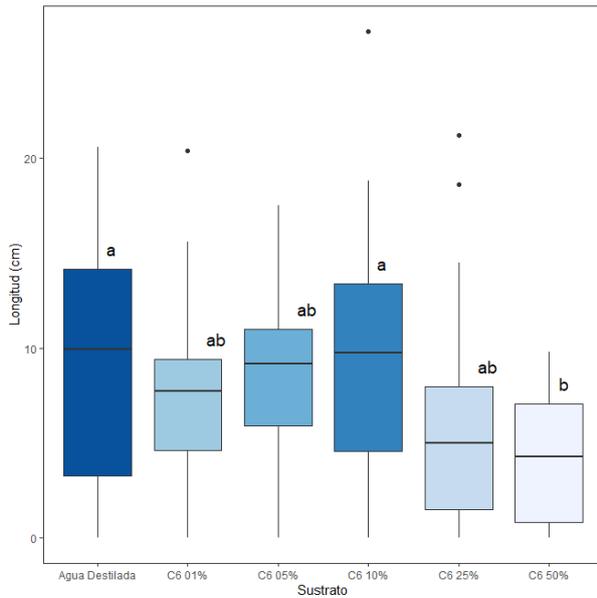
Diagrama de caja: longitud de las raíces bajo tratamiento con tinte degradado por K6



Nota. Se muestra la longitud en cm de las raíces tratadas con extracto de tinte CBB degradado por la bacteria K6 en cada dilución realizada. Se muestra en letras las comparaciones muestrales de ANOVA (Tukey: $p < 0.05$).

Figura 4

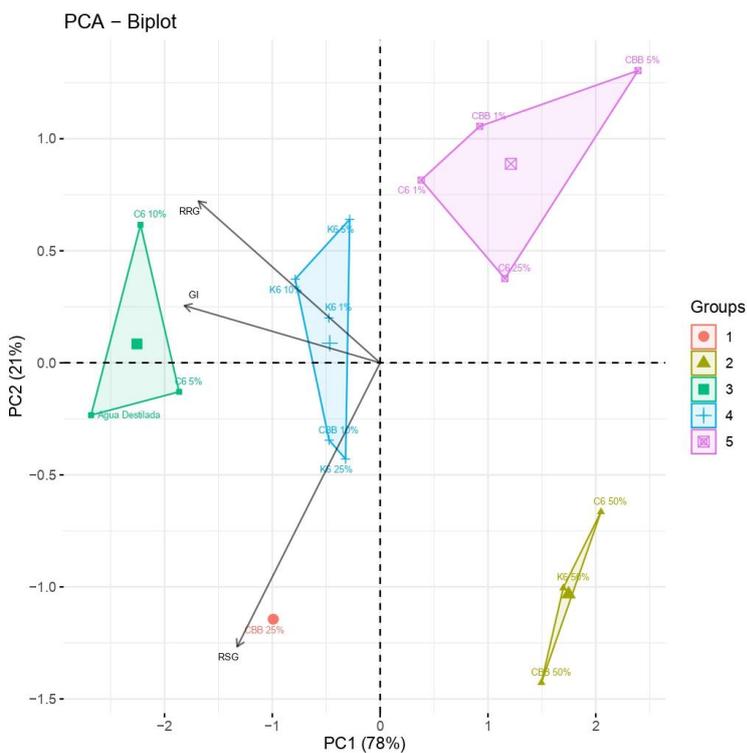
Diagrama de caja: longitud de las raíces bajo tratamiento con tinte degradado por C6



Nota. Se muestra la longitud en cm de las raíces tratadas con extracto de tinte CBB degradado por la bacteria C6 en cada dilución realizada. Se muestra en letras las comparaciones muestrales de ANOVA (Tukey: $p < 0.05$).

Figura 5

PCA – Biplot + cluster de todos los tratamientos



Nota. Se muestra el agrupamiento de los tratamientos en un diagrama PCA-Biplot, los componentes explican el 99% de los datos.

Evaluación microscópica

Teniendo en cuenta el potencial del degrado de tinte por la bacteria C6 al 10%, este sustrato fue evaluado junto a el tinte en su composición original al 10% y el agua destilada como sustancia control para averiguar diferencias a nivel microscópico en el crecimiento de las raíces de *Phaseolus vulgaris*.

Utilizando agua destilada, las raíces no presentan deformaciones evidentes (Figura 8), además que mantienen colores usuales en todo el tejido. Por otro lado, las raíces crecidas bajo influencia del tinte original (Figura 6) tampoco presentaron deformaciones, pero sí contenían rastros del pigmento tanto en su superficie externa como en células dentro del tejido observado, esto es normal puesto que se ha evidenciado la absorción del tinte CBB en varias especies vegetales y su almacenamiento y lenta degradación en raíces paredes de lignina (Nour, 2017; Oliveira, 2024). Esta situación del CBB se vió replicada en el análisis microscópico de las raíces crecidas en sustrato C6 10% (Figura 7), aunque en mucha menor cantidad, los restos de evidente coloración azul dentro de las raíces sugieren la degradación incompleta del tinte original y su posterior ingreso a las células, aun así, es necesario determinar la naturaleza química de estos restos.

Figura 6

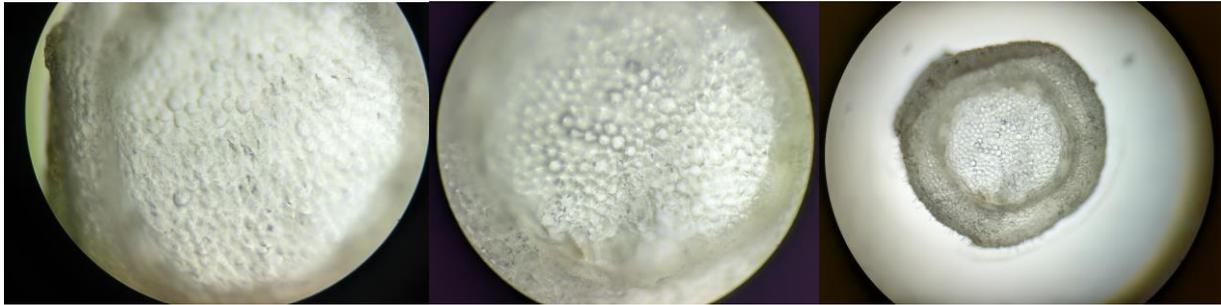
Observaciones microscópicas de raíces en tinte CBB



Nota. Se muestra en el microscopio los cortes transversales de las raíces crecidas con tinte CBB 10%, observándose pigmentaciones azules en la superficie y dentro de las células.

Figura 7

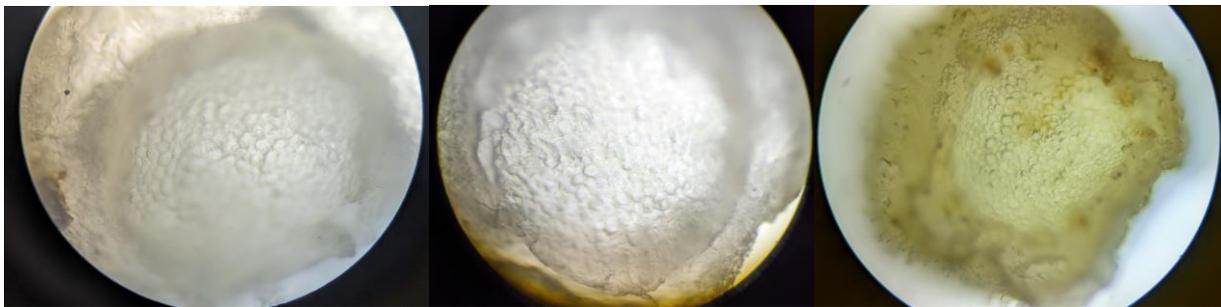
Observaciones microscópicas de raíces en tinte degradado por C6



Nota. Se muestra en el microscopio los cortes transversales de las raíces crecidas con tinte degradado por C6 10%, observándose pocas pigmentaciones azules dentro de las células.

Figura 8

Observaciones microscópicas de raíces en Agua



Nota. Se muestra en el microscopio los cortes transversales de las raíces crecidas en agua destilada, observándose disposición y coloración uniforme y normal.

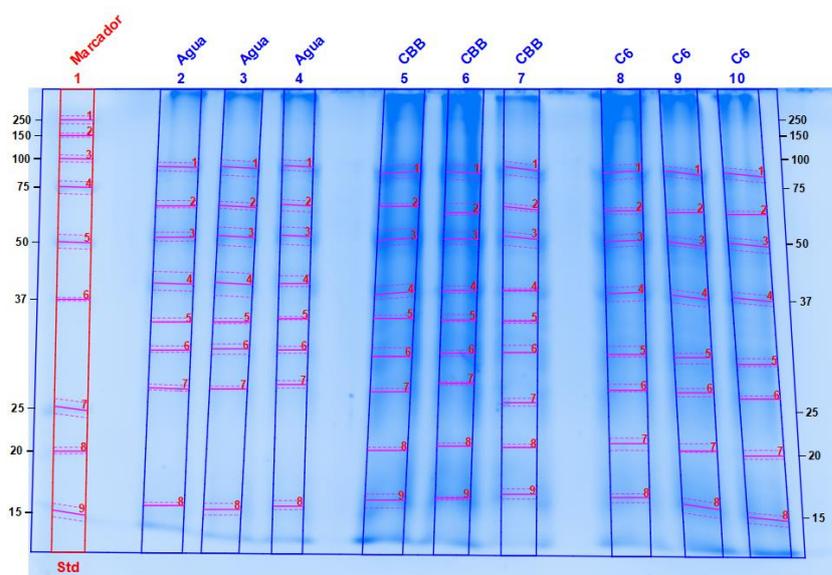
Evaluación de proteínas: SDS-PAGE

Del mismo modo, se realizó un perfil de proteínas extraídas de las raíces de *Phaseolus vulgaris* crecidas en agua destilada, tinte CBB 10% y extracto de tinte degradado C6 10% como se muestra en la Figura 9. En primer lugar, se reconocen entre 8 y 9 bandas de mayor concentración en cada carril del gel de poliacrilamida, los carriles 2, 3 y 4 pueden ser considerados como el perfil basal de proteínas en las raíces de *Phaseolus vulgaris*, perfil que es más traslúcido que los carriles 5, 6 y 7 correspondientes al crecimiento en CBB 10% donde existe una mayor expresión de las proteínas ubicadas en las bandas por encima de los 50 kDa. Por último, los carriles 8, 9 y 10 representan un perfil de intensidad intermedio entre los

crecimientos con Agua y CBB, aun así, tanto C6 como CBB promueven la aparición de proteínas cerca de los 20 kDa. Estas diferencias establecen la necesidad de estudiar las principales proteínas diferenciadoras en búsqueda de marcadores de signos de estrés o desarrollo considerando que tanto el tinte como el degradado contienen metabolitos que pueden ser utilizados como nutrientes de las plantas.

Figura 9

SDS-PAGE: perfil de proteínas en las raíces crecidas



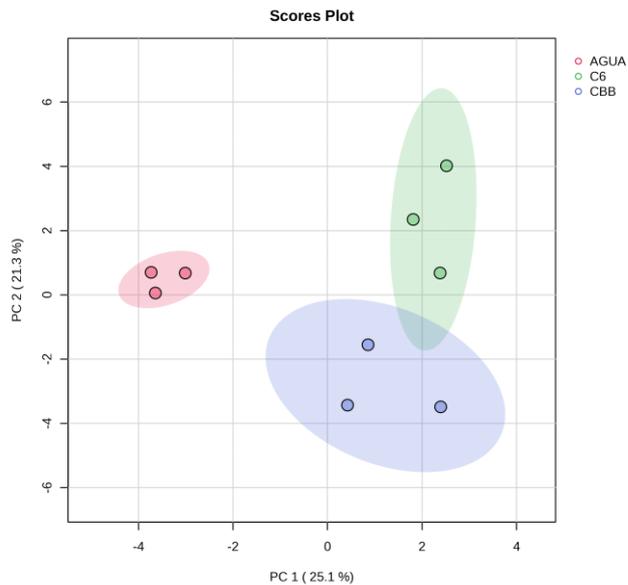
Nota. Se muestra el perfil proteómico de las raíces crecidas con agua destilada, tinte CBB 10% y tinte degradado por bacteria C6 10%, analizadas con el software ImageLab 6.0.

Posteriormente, el gel de poliacrilamida fue analizado con el software Metaboanalyst 6.0 según la intensidad y peso molecular de las proteínas en el gel. En primer lugar, un PCA reveló una pequeña tendencia a separar los grupos de Agua, C6 y CBB, por lo que la intensidad interpretada como la cantidad de proteínas expresadas jugó un factor importante al momento de establecer las diferencias para estos tres grupos. Así mismo, un ANOVA reveló las proteínas de peso molecular 65.57, 92.22, 40.30 y 38.40 kDa son las más importantes dentro de la agrupación independiente de cada tratamiento para las raíces. De esta manera, estas 4 proteínas sufren cambios en su expresión y su análisis puede proveer información sobre las principales rutas metabólicas activadas tras el uso del tinte CBB y el degradado por C6, complementando así la

información sobre la fitotoxicidad y potencial fuente de nutrición aportada por la degradación del pigmento textil.

Figura 10

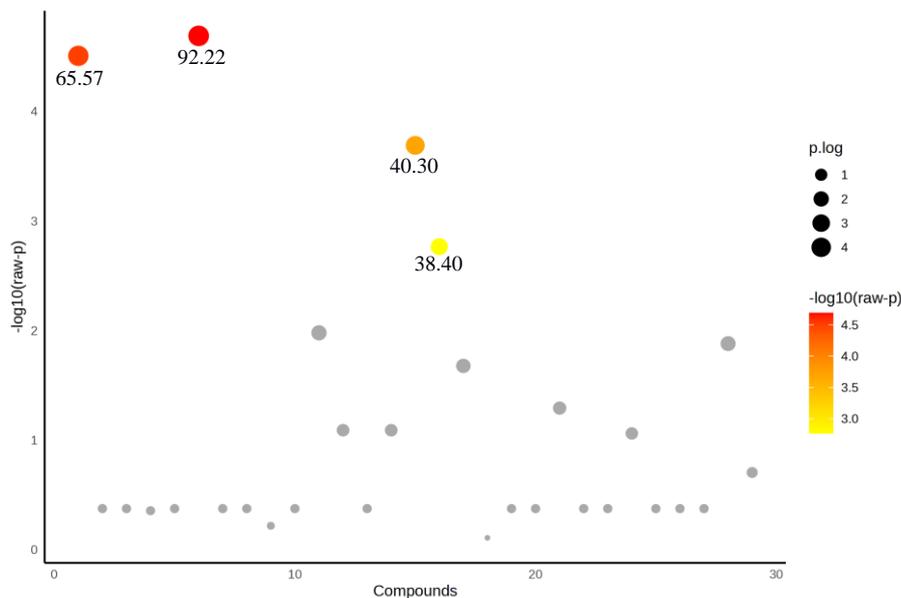
PCA: Agrupamiento de los diferentes tratamientos según sus proteínas del SDS-PAGE



Nota. La figura muestra el agrupamiento estadístico de los tratamientos (Agua, C6 10% y CBB 10%) según las proteínas identificadas por su peso molecular y la intensidad de su expresión.

Figura 11

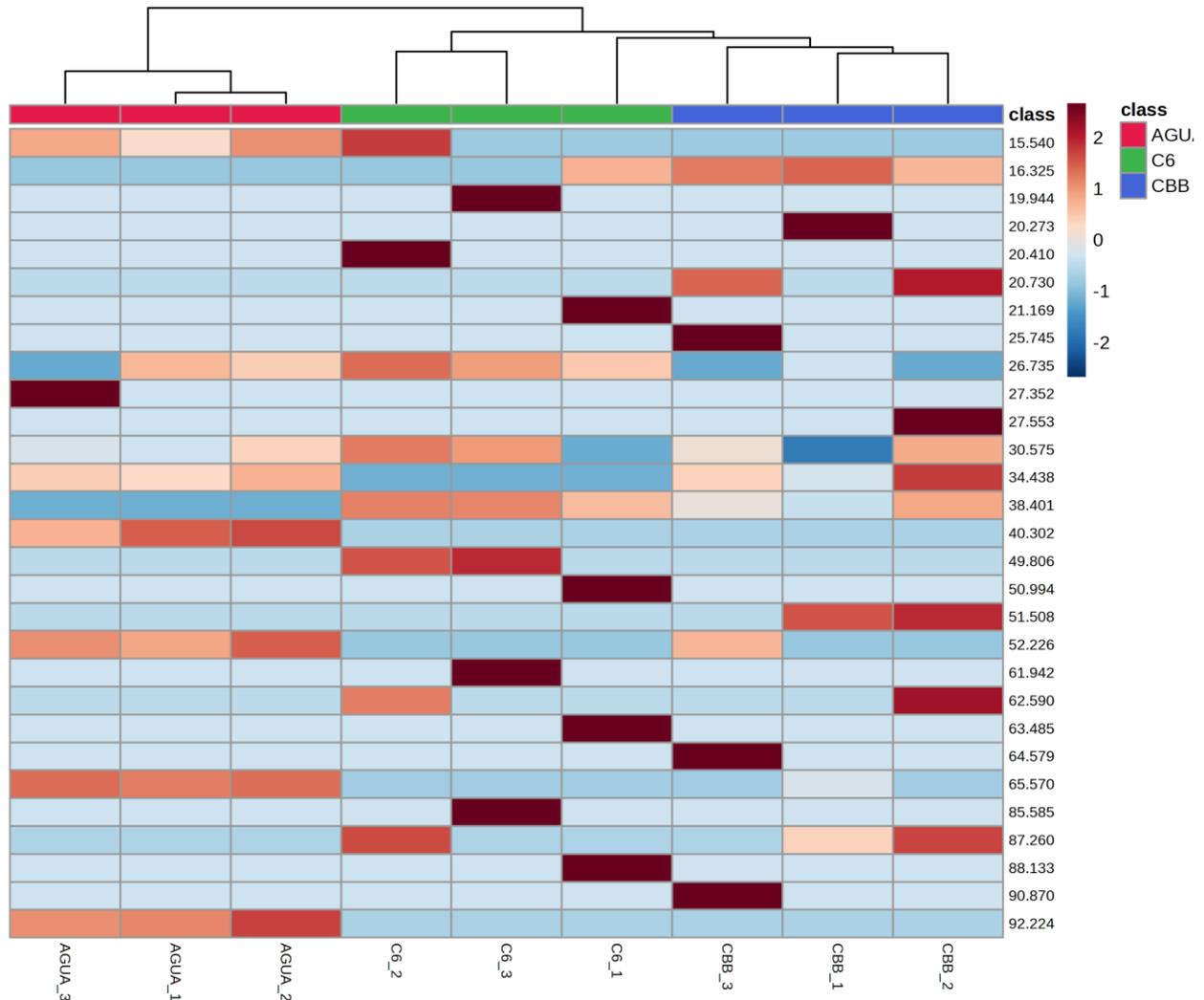
ANOVA: Proteínas del SDS-PAGE según su relevancia para explicar las diferencias muestrales



Nota. La figura muestra en color las 4 principales proteínas que permiten deducir diferencias muestrales de los tratamientos, ANOVA (Tukey: $p < 0.05$).

Figura 12

Mapa de calor de las proteínas del SDS-PAGE



Nota. La figura muestra un mapa de calor con las proteínas del SDS-PAGE coloreadas según su intensidad, en la parte superior se muestra un agrupamiento basado en la cercanía de las proteínas por su peso molecular y la intensidad de cada una.

Finalmente, un mapa de calor reveló las intensidades de cada banda en cada línea del gel de poliacrilamida. Además de revelar las principales proteínas por intensidad, se reveló un agrupamiento que diferencia el control de agua con los demás tratamientos. Sin embargo, aunque agrupa a CBB dentro de C6, el tratamiento con C6 a su vez se ubica con mayor proximidad al control por sus características, demostrando la naturaleza intermedia del degradado de pigmento textil en cuanto al desarrollo de las semillas de *Phaseolus vulgaris*.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

Después de haber identificado las posibles soluciones, además del diseño y planificación de la metodología empleada, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- El agua residual producto de la degradación la cepa bacteriana C6, resulto ser la mejor al permitir la germinación y crecimiento de semillas de frejol, *Phaseolus vulgaris*, logrando que una dilución al 10% sea suficiente para mejorar los resultados de la germinación.
- Al observar los crecimientos en el microscopio, se encontró la presencia de partículas de coloración azul en el tejido de las raíces crecidas con tinte degradado. Aun así, el tejido no presenta deformidades.
- El perfil proteómico permitió establecer diferencias moleculares en el tejido de las raíces crecidas bajo los diferentes tratamientos, identificando a niveles generales las principales proteínas expresadas en cada tratamiento.

4.1.2 Recomendaciones

Finalmente, tras haber culminado los análisis pertinentes a esta problemática, se obtuvieron las siguientes recomendaciones:

- Ampliar el ensayo de fitotoxicidad en el tiempo, abarcando aspectos como la altura y desarrollo de las hojas, además de evaluar nuevos tejidos vegetales aéreos en busca de modificaciones causadas por estrés y toxicidad.
- Analizar los metabolitos resultantes del proceso de degradación de tinte textil, con el fin de explicar el proceso de degradación y ampliar, de ser necesario, a una fitorremediación que ayude a eliminar residuos tóxicos.
- Analizar las proteínas que tuvieron una expresión diferente y significativa en los tratamientos, de esta manera se puede deducir el principal rol, nutricional o de

estresante, de los productos de degradación del tinte textil en el desarrollo de las plantas.

Referencias

- Bala, S., Garg, D., Banjagere Veerabhadrapa Thirumalesh, Sharma, M., Sridhar, K., Baskaran Stephen Inbaraj, & Tripathi, M. (2022). Recent Strategies for Bioremediation of Emerging Pollutants: A Review for a Green and Sustainable Environment. *Toxics*, 10(8), 484–484. <https://doi.org/10.3390/toxics10080484>
- Bhandari, S., Darbin Kumar Poudel, Rishab Marahatha, Sonika Dawadi, Khadayat, K., Sitaram Phuyal, Shrestha, S., Santosh Gaire, Kusum Basnet, Uddhav Khadka, & Niranjana Parajuli. (2021). Microbial Enzymes Used in Bioremediation. *Journal of Chemistry*, 2021, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2021/8849512>
- Bravo Donoso, D. N., & Caiza Changoluisa, G. A. (2022). Revisión de la Economía Circular como Modelo Económico del Sector Textil en Ecuador. *INGENIO*, 5(2), 14–23. <https://doi.org/10.29166/ingenio.v5i2.4231>
- Camilo-Cotrim, C.; Flávia, E., Luciana Souza Ondeí, Fernanda Melo Carneiro, & Luciane Madureira Almeida. (2022). What can the *Allium cepa* test say about pesticide safety? A review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(32), 48088–48104. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20695-z>
- D. Krewski, Andersen, M. E., Tyshenko, M. G., Krishnan, K., Hartung, T., K. Boekelheide, Wambaugh, J. F., Jones, D., Whelan, M., Thomas, R., Yauk, C., T. Barton-Maclaren, & Cote, I. (2019). Toxicity testing in the 21st century: progress in the past decade and future perspectives. *Archives of Toxicology*, 94(1), 1–58. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02613-4>

- Debora, Noma, Okamoto., Lilian, Carolina, Gonçalves, de, Oliveira., José, Antônio, Manzato., Eduardo, Alves, de, Almeida., Carlos, Roberto, Ceron., Gustavo, Orlando, Bonilla-Rodriguez. (2009). Coomassie Brilliant blue dye toxicity screen using *Drosophila melanogaster* (Diptera - Drosophilidae). 40-47.
- Deng, D., Lamssali, M., Aryal, N., Ofori-Boadu, A., Jha, M.K. and Samuel, R.E. (2020), Textiles wastewater treatment technology: A review. *Water Environ. Res.*, 92: 1805-1810. <https://doi.org/10.1002/wer.1437>
- Garcés Giraldo, L. F., Hernández Ángel, M. L., Peñuela Mesa, G. A., Rodríguez Restrepo, A., & Salazar Palacio, J. A. (2005). Degradación de aguas residuales de la industria textil por medio de fotocatalisis. *Revista Lasallista de Investigación*, 2(1), 15-18.
- Guevara, M. (2024). La producción manufacturera y generación de aguas residuales del Ecuador. [Proyecto de Investigación Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/bitstream/123456789/40755/1/T6088e.pdf>
- Ihsanullah Ihsanullah, Jamal, A., Ilyas, M., Zubair, M., Khan, G., & Muataz Ali Atieh. (2020). Bioremediation of dyes: Current status and prospects. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101680–101680. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101680>
- Kebede, G.; Tafese, T.; Abda, E.; Kamaraj, M.; Assefa, F. (2021). Factors Influencing the Bacterial Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants in the Soil: Mechanisms and Impacts, *Journal of Chemistry*, 9823362, 17 pages. <https://doi.org/10.1155/2021/9823362>
- Liu, L., Wu, Q., Miao, X., Fan, T., Meng, Z., Chen, X., & Zhu, W. (2022). Study on toxicity effects of environmental pollutants based on metabolomics: A

review. *Chemosphere*, 286, 131815–131815.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131815>

Llanos Encalada, M., & Salazar Cueva, Á. D. (2023). Efectos post pandemia en el desempeño del sector industrial textil ecuatoriano de ropa liviana: periodo 2020-2021. *ECA Sinergia*, 14(3), 129-141. <https://doi.org/10.33936/ecasinergia.v14i3.5665>

Mehrotra, T., Dev, S., Banerjee, A., Chatterjee, A., Singh, R., & Aggarwal, S. (2021). Use of immobilized bacteria for environmental bioremediation: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105920–105920.

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105920>

Moyo, S., Makhanya, B. P., & Zwane, P. E. (2022). Use of bacterial isolates in the treatment of textile dye wastewater: A review. *Heliyon*, 8(6), e09632–e09632.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09632>

Namita Panigrahy, Ankita Priyadarshini, Mitali Madhusmita Sahoo, Akshaya Kumar Verma, Achlesh Daverey, & Naresh Kumar Sahoo. (2022). A comprehensive review on ecotoxicity and biodegradation of phenolics: Recent progress and future outlook. *Environmental Technology & Innovation*, 27, 102423–102423.

<https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102423>

Nasamues, J. (2021). Metodologías para evaluar sistemas de tratamiento de aguas residuales en el Ecuador. [Proyecto de Investigación Universidad Nacional de Chimborazo].

<http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/7659/3/DESARROLLO%20DEL%20PROYECTO%20DE%20INVESTIGACIÓN%20Jessica%20Nasamues.pdf>

- Nour, T., Abdel-Ghani., Ghadir, A., El-Chaghaby., El-Shaimaa, A., Rawash., Eder, C., Lima. (2017). Adsorption of coomassie brilliant blue r-250 dye onto novel activated carbon prepared from nigella sativa l. waste: equilibrium, kinetics and thermodynamics running title: adsorption of brilliant blue dye onto nigella sativa l. waste activated carbon. *Journal of The Chilean Chemical Society*, 62(2):3505-3511. doi: 10.4067/S0717-97072017000200016
- Núñez Moreno, M. S., Moreno Albuja, M. C., Moscoso Moreno, N. K. & Velasteguí López, E. (2023). Toxicidad de aguas residuales textiles en Ambato: evaluación del conocimiento de decisores. *Revista Universidad y Sociedad*, 15(2), 306-315.
- Nurul Hidayah Adenan, Yau Yan Lim, & Su, A. (2022). Removal of triphenylmethane dyes by *Streptomyces bacillaris*: A study on decolorization, enzymatic reactions and toxicity of treated dye solutions. *Journal of Environmental Management*, 318, 115520–115520. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115520>
- Oliveira, K. M., Pereira de Sousa., Fernando, Silveira. (2024). Coconut fibers as a natural adsorbent to brilliant coomassie blue dye adsorption. *International journal of petrochemical science & engineering*, 7(1):29-32. doi: 10.15406/ipcse.2024.07.00140
- Patel, A.; Singhania, R. Paolo, F., Pandey, A., Chen, C.-W., & Dong, C.-D. (2022). Organic wastes bioremediation and its changing prospects. *Science of the Total Environment*, 824, 153889–153889. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153889>
- Pinheiro, L.R.S.; Gradíssimo, D.G.; Xavier, L.P.; Santos, A.V. (2022). Degradation of Azo Dyes: Bacterial Potential for Bioremediation. *Sustainability*, 14, 1510. <https://doi.org/10.3390/su14031510>
- Prathap Somu, Saranya Narayanasamy, Levin Anbu Gomez, Rajendran, S., Yong Rok Lee, & Balakrishnan, D. (2022). Immobilization of enzymes for bioremediation: A future

remedial and mitigating strategy. *Environmental Research*, 212, 113411–113411.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113411>

Ramos, K., Parada, M., & Godoy, S. (2023). EVALUACIÓN Y DISEÑO DE UN SISTEMA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL PARA LA FÁBRICA TEXTIL HILARIO.

Perfiles, 1(19), 3-13. <https://doi.org/10.47187/perf.v1i19.13>

Sadia Afrin, Hasibur Rahman Shuvo, Sultana, B., Islam, F., Ahmed Abu Rus'd, Begum, S., &

Md Nur Hossain. (2021). The degradation of textile industry dyes using the effective bacterial consortium. *Heliyon*, 7(10), e08102–e08102.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08102>

Sales da Silva, I.G.; Gomes de Almeida, F.C.; Padilha da Rocha e Silva, N.M.; Casazza, A.A.;

Converti, A.; Asfora Sarubbo, L. (2020). Soil Bioremediation: Overview of Technologies and Trends. *Energies*, 13, 4664. <https://doi.org/10.3390/en13184664>

Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J.-S., & Govindwar, S. P. (2010). Decolorization and biodegradation of reactive dyes and dye wastewater by a developed bacterial consortium. *Biodegradation*, 21(6), 999–1015. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9360-1>

Seyyed M.; Seyyed A.; Iman, M., Ravan, N., Gholami, A., Chin Wei Lai, Chiang, W.-H., Navid

Omidifar, Yousefi, K., & Gity Behbudi. (2021). Recent Advances in Enzymes for the Bioremediation of Pollutants. *Biochemistry Research International*, 2021, 1–12.

<https://doi.org/10.1155/2021/5599204>

Shah, A., & Shah, M. (2020). Characterisation and bioremediation of wastewater: A review exploring bioremediation as a sustainable technique for pharmaceutical

wastewater. *Groundwater for Sustainable Development*, 11, 100383–100383.

<https://doi.org/10.1016/j.gsd.2020.100383>

Shanmugam Sudarshan, Sekar Harikrishnan, Govindarajan RathiBhuvanewari, Venkatesan

Alamelu, Samraj Aanand, Aruliah Rajasekar, & Muthusamy Govarthan. (2022).

Impact of textile dyes on human health and bioremediation of textile industry effluent using microorganisms: current status and future prospects. *Journal of Applied Microbiology*, 134(2). <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac064>

Vaz G., A.; Carolini M.; Saran, L.; & Carareto L. (2022). Enzymatic Bioremediation of Dyes from Textile Industry Effluents. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.103064

Xiaoxuan Wang, Jinming Jiang, Weijun Gao; Reviewing textile wastewater produced by industries: characteristics, environmental impacts, and treatment strategies. *Water Sci Technol* 1 April 2022; 85 (7): 2076–2096. doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2022.088>

Zafar, H., Javed, R., & Zia, M. (2023). Nanotoxicity assessment in plants: an updated overview. *Environmental Science and Pollution Research International*, 30(41), 93323–93344. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29150-z>

Zhao, J., Wu, Q.-X., Cheng, X.-D., Su, T., Wang, X.-H., Zhang, W.-N., Lu, Y.-M., & Chen, Y. (2021). Biodegradation and detoxification of the triphenylmethane dye coomassie brilliant blue by the extracellular enzymes from mycelia of *Lactarius deliciosus*. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 15(2), 421–436. <https://doi.org/10.1007/s11705-020-1952-7>